



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁴ : A23J 1/20	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 89/10064 (43) Date de publication internationale: 2 novembre 1989 (02.11.89)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR88/00192</p> <p>(22) Date de dépôt international: 20 avril 1988 (20.04.88)</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): APPLICATIONS TECHNIQUES NOUVELLES [FR/FR]; 13, rue des Filmins, F-92330 Sceaux (FR).</p> <p>(72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement) : DUBOIS, Ernest [FR/FR]; 13, rue des Filmins, F-92330 Sceaux (FR).</p> <p>(74) Mandataires: DE BOISSE, L., A. etc. ; Cabinet de Boisse, 37, avenue Franklin-D.-Roosevelt, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK, FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.</p>		<p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>
<p>(54) Title: PROCESS FOR SEPARATING CERTAIN PROTEINS FROM WHEY OR MILK</p> <p>(54) Titre: PROCÉDE DE SEPARATION DE CERTAINES PROTEINES DU LACTOSERUM OU DU LAIT</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Process for separating and fractionating proteins having a high molar mass from a liquid containing this type of protein, comprising an ultrafiltration stage designed to produce a retentate enriched in said proteins and a permeate, effected with a porous membrane, the cut-off level of which is at least 40,000 daltons and continued up to a concentration factor of at least 40, followed by a selective fractionating stage for said retentate on a chromatographic support. Application: processing of whey in particular.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne un procédé de séparation et de fractionnement des protéines de masse molaire élevée contenues dans un liquide chargé de ce type de protéines, qui comprend une étape d'ultrafiltration visant à produire un rétentat enrichi en lesdites protéines et un perméat, effectuée avec une membrane poreuse dont le seuil de coupure est d'au moins 40 000 daltons et poursuivie jusqu'à un facteur de concentration d'au moins 40, suivie d'une étape de fractionnement sélectif dudit rétentat sur un support chromatographique. Application notamment au traitement du lactosérum.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	ML	Mali
AU	Australie	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BE	Belgique	HU	Hongrie	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	IT	Italie	NO	Norvège
BJ	Bénin	JP	Japon	RO	Roumanie
BR	Brésil	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Danemark	MG	Madagascar	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande				

Procédé de séparation de certaines protéines du lacto-
sérum ou du lait

L'invention concerne un procédé de préparation
5 et de fractionnement des protéines de masse molaire élevée
contenues dans un liquide chargé de ce type de protéines.

Le lactosérum est un sous-produit de l'industrie
fromagère, autrefois rejeté, que l'on cherche depuis quel-
ques années à valoriser en extrayant de celui-ci certaines
10 matières utiles. Typiquement, le lactosérum contient envi-
ron 40-80g de matières sèches par litre, ces matières sè-
ches étant formées de lactose, de matières minérales, et
de matières azotées dont 65% en poids environ sont formées
de protéines. Ces protéines sont formées à leur tour, en
15 poids, d'environ 80% d'albumines, 10% d'immunoglobulines
et 10% de protéines diverses telles que la lactoferrine
(2% environ) et la lactoperoxydase, et présentent un grand
intérêt dans divers domaines (nutrition, préparation de
laits maternisés, etc...). On connaît déjà divers procédés
20 visant à récupérer les protéines du lactosérum ou autre
dérivé du lait.

Ainsi, FR-A-2 204 948 décrit un procédé d'obtention
de concentré de protéines solubles dans l'eau, par exemple
en ultra-filtrant du petit-lait, puis en le concentrant
25 par passage sur un gel chromatographique. Ce procédé anté-
rieur est un procédé global qui ne permet pas de séparer
les différents types de protéines contrairement au procédé
de l'invention.

B.N. Mathur et coll. dans le Journal of Dairy
30 Science vol. 62, N° 1, Janvier 1979, pages 95-105, évoquent
la possibilité de fractionner les protéines d'un concentré
de protéines par filtration sur gel, mais sans en divulguer
véritablement les modalités techniques. Si, par ailleurs,
cet article mentionne l'ultrafiltration comme l'une des
35 techniques permettant de préparer le concentré de protéi-
nes, il ne suggère nullement, de conduire l'ultrafiltra-
tion à un taux de concentration élevé, égal ou supérieur à

40 et avec une membrane dont le seuil de coupure approche celui préconisé par la présente invention.

FR-A-2 103 265 décrit un procédé de production d'un concentré de protéines à partir de petit-lait au moyen d'étapes d'ultrafiltration successives, éventuellement suivies d'une étape de filtration sur gel. Ce procédé est aussi un procédé global qui ne vise pas à fractionner les différents types de protéines, contrairement au procédé de l'invention.

FR-A-2 452 881 a trait à un procédé de séparation et de fractionnement de protéines animales ou végétales par traitement de sources de telles protéines, telles que, par exemple, le lactosérum ou le lait, par des techniques de chromatographie d'exclusion et d'échange d'ions, la source de départ pouvant être prétraitée par diverses techniques incluant, entre autres, l'ultrafiltration. Le procédé implique l'emploi de plusieurs types de résines à propriétés spécifiques. Aucune fonction de fractionnement n'est impartie à l'étape d'ultrafiltration qui sert uniquement à concentrer la source de départ.

FR-A-2 487 642, qui est une addition au précédent, vise un procédé du genre de celui de FR-A-2 452 881 dans laquelle la matière est soumise à une ultrafiltration sur membrane avant ou après le passage sur les résines. Les facteurs de concentration mis en jeu sont de l'ordre de 5 seulement. Comme pour FR-A-2 452 881 l'ultrafiltration n'est pas employée pour séparer les protéines de masse molaire élevée (supérieure à 50 000 daltons) des protéines de plus basse masse molaire, des peptides et des acides aminés.

Aucun des documents antérieurs précités ne décrit donc un procédé permettant de séparer sélectivement les protéines de masse molaire élevée d'un liquide les contenant.

Il existe donc un besoin pour un procédé permettant une telle séparation sélective.

L'invention vise à fournir un tel procédé.

Plus particulièrement, l'invention concerne un procédé de séparation et de fractionnement des protéines de masse molaire élevée contenues dans un liquide chargé de ce type de protéines, qui comprend deux étapes :

5 a) une étape d'ultrafiltration visant à produire un rétentat enrichi en lesdites protéines et un perméat contenant le reste dudit liquide, et

b) une étape de fractionnement sélectif du rétentat obtenu en (a) sur un support chromatographique,
10 procédé caractérisé en ce que :

(i) l'ultrafiltration est effectuée avec une membrane poreuse ayant un seuil de coupure d'au moins 40000 daltons,
(ii) le liquide chargé de protéines à traiter par ultrafiltration présente un pH de 5 à 8,5 et une force ionique
15 de 0,2 à 1 molaire, et

(iii) l'ultrafiltration (a) est poursuivie jusqu'à obtention d'un facteur de concentration d'au moins 40.

De préférence, l'ultrafiltration est poursuivie jusqu'à obtention d'un facteur de concentration d'au moins
20 100.

L'invention est particulièrement adaptée au cas où le liquide chargé de protéines est du lactosérum déca-séiné, préconcentré ou non, déminéralisé ou non, mais peut également être appliquée à d'autres liquides chargés
25 de protéines de masse molaire élevée, par exemple du lait démicellé et décaséiné, préconcentré ou non, déminéralisé ou non, ou du lactosérum délipidé reconstitué par solubilisation à partir d'un lactosérum à l'état solide par des procédés classiques. On pourrait également traiter
30 des substances d'origine végétale (jus de fruits par exemple) ou animale (colostrum par exemple), telles qu'obtenues ou après un prétraitement de celles-ci.

Les protéines contenues dans le lactosérum ou autre produit laitier, se différencient par leur masse
35 molaire. On distingue ainsi :

- la fraction des albumines

α - lactalbumine	14000 daltons* environ
β - lactoglobuline	18000 daltons environ

- la fraction des immunoglobulines 180000 daltons environ
- la fraction de la lactoferrine et de la lactoperoxydase 80000 daltons environ.

5 * Le dalton est l'unité utilisée pour définir la masse molaire d'une molécule. 1 dalton est égal à 1/16 de la masse d'un atome d'oxygène.

10 L'étape (a) d'ultrafiltration du procédé de l'invention a pour but de séparer du mieux possible le lactose et les albumines des fractions immunoglobulines et lactoferrine + lactoperoxydase. La séparation n'est toutefois pas efficace à 100% car une fraction des protéines de masse molaire élevée traverse la membrane et une fraction des protéines de masse molaire peu élevée est quand même retenue par la membrane. Le taux de rétention
15 d'une protéine définit sa propension à être retenue par une membrane donnée dans des conditions données. Ce taux n'est jamais, en pratique, égal à 100%.

20 A cette fin, l'ultrafiltration (a) est effectuée avec une membrane semi-perméable ayant un seuil de coupure d'au moins 40000 daltons, c'est-à-dire retenant préférentiellement les molécules de masse molaire supérieure à 40000 daltons.

25 Avantageusement, la membrane utilisée aura un seuil de coupure entre 40000 et 80000 daltons environ. La membrane utilisée peut être de nature organique ou minérale. Avantageusement, l'ultrafiltration (a) est conduite en au moins deux stades. Un premier stade est effectué avec une première membrane jusqu'à un taux de concentration de 5 à 10 par exemple, et un deuxième stade est
30 opéré sur le rétentat obtenu dans le premier stade avec une deuxième membrane jusqu'à obtention du taux de concentration final désiré. Les première et deuxième membranes peuvent être de nature identique ou différente. Diverses membranes pouvant être employées pour réaliser
35 l'ultrafiltration (a) sont disponibles dans le commerce. On peut citer, à titre d'exemples non limitatifs, les membranes organiques commercialisées sous les marques AMICON (Groupe GRACE) et PLEIADE (Groupe RHONE-POULENC) ou

les membranes minérales commercialisées sous la marque CARBOSEP par la Société TECH-SEP (Groupe RHONE-POULENC).

Le liquide, tel que le lactosérum, soumis à l'ultrafiltration (a) doit présenter un pH compris dans la gamme de 5 à 8,5 environ, de préférence de 7 à 8,5, et une force ionique comprise entre 0,2 et 1 molaire environ. La force ionique requise peut être obtenue en ajoutant un sel convenablement choisi, tel que le chlorure de sodium, au liquide à traiter. Pour éviter une saveur trop salée, on règlera de préférence la force ionique entre 0,2 et 0,5 molaire. Ces conditions se sont révélées nécessaires pour éviter un phénomène de polarisation important pouvant modifier le seuil de coupure de la membrane.

L'ultrafiltration (a) produit un perméat (formé principalement d'eau, de lactose et des albumines) et un rétentat (formé principalement d'eau, des immunoglobulines, de la lactoferrine et de la lactoperoxydase). L'ultrafiltration (a) doit être conduite dans des conditions amenant un facteur de concentration final (rapport de liquide initial/volume de rétentat) d'au moins 40 et pouvant atteindre 100 et plus. La seule limite imposée au facteur de concentration est que la concentration de protéines dissoutes dans le rétentat ne devienne pas si élevée qu'elle provoque la gélification du rétentat. Habituellement, la concentration limite des protéines est de l'ordre de 200-250 g/litre. Un facteur de concentration de 40 et plus représente un facteur de concentration inhabituel. Habituellement, dans les procédés antérieurs mettant en jeu une ultrafiltration, on utilise des facteurs de concentration inférieurs à 10, typiquement de 5 ou 6. Le facteur de concentration élevé utilisé dans le présent procédé offre plusieurs avantages :

- il permet d'obtenir un rétentat, concentré en immunoglobulines, lactoferrine et lactoperoxydase, ce qui permet d'utiliser une installation de chromatographie compacte, donc économique, pour effectuer ensuite l'étape (b),
- il permet d'obtenir un enrichissement relatif important du rétentat en les protéines ayant les taux de rétention

par la membrane les plus élevés.

5 L'étape de fractionnement sélectif sur gel chromatographique du rétentat provenant de l'ultrafiltration (a) peut être conduite en faisant passer le rétentat sur une
10 colonne garnie d'un support chromatographique approprié à l'aide d'un agent d'élution. Ce fractionnement est basé sur les capacités différentes des molécules des diverses protéines contenues dans le rétentat à pénétrer dans les pores du support stationnaire. Les très grosses molécules
15 ne pénètrent pas dans le support et traversent donc plus rapidement le support chromatographique. Les plus petites molécules pénètrent par contre dans le support chromatographique et sont éluées plus lentement.

20 Pour la séparation, d'une part, de la fraction immunoglobulines et, d'autre part, de la fraction lactoferrine + lactoperoxydase, on peut utiliser un support chromatographique (souvent appelé gel chromatographique) se présentant sous la forme de billes et dont le domaine de fonctionnement correspond au moins à la gamme de masses
25 molaires des protéines à séparer, par exemple de 5000 à 250000 daltons. Un tel support séparera le rétentat en ses constituants, suivant leur masse molaire, en deux fractions ou plus. Le support utilisé sera préalablement équilibré par un tampon de force ionique élevée afin de limiter les associations protéines-protéines, notamment
30 pour éviter la polymérisation éventuelle des bêta-lactoglobulines résiduelles.

Divers supports chromatographiques utilisables sont disponibles dans le commerce. A titre d'exemples non
35 limitatifs on peut citer, par exemple, le SEPHADEX G 150 (dextrane réticulé) et le SEPHACRYL S200 (dextrane allylique réticulé par du N,N'-méthylène bis-acrylamide).

Comme agents d'élution, on peut utiliser, par exemple, du TRIS (tris(hydroxyméthyl)amino méthane), du
35 tampon phosphate (mélange de phosphates mono- et di-sodiques), etc... D'autres supports chromatographiques et d'autres agents d'élution utilisables seront évidents pour l'homme du métier. L'agent d'élution doit avoir un pH du

même ordre que celui du liquide à traiter.

A titre indicatif, on peut traiter à chaque cycle de fractionnement chromatographique un volume d'échantillon allant de 5 à 15% environ du volume du support chromatographique contenu dans la colonne et des débits d'élution allant de 0,5 à 1 fois environ le volume dudit support par heure. Ces conditions n'ont toutefois rien de critique et il est parfaitement à la portée de l'homme du métier de déterminer des conditions appropriées.

La technique chromatographique exposée ci-dessus est également communément appelée filtration sur gel. Il y a lieu de noter, cependant, que l'invention n'est pas limitée à l'emploi de cette technique particulière. On pourrait, par exemple, avoir recours à une technique chromatographique utilisant des résines échangeuses d'ions, à une technique de chromatographie liquide haute pression, etc...

La description qui va suivre, faite en se référant au dessin annexé, fera bien comprendre l'invention.

Sur le dessin :

La figure 1 est une représentation schématique d'une installation d'ultrafiltration ;

La figure 2 est une représentation schématique d'une installation de fractionnement sur support chromatographique ; et

La figure 3 représente un diagramme d'élution typique.

Sur la figure 1, du lactosérum décaséiné est stocké dans un réservoir 1 muni à sa partie inférieure d'un filtre 2 en verre fritté, retenant les particules solides éventuellement présentes dans le lactosérum, et alimente une pompe péristaltique 3 de circulation qui envoie le lactosérum dans un module 4 d'ultrafiltration comprenant une membrane 5, logée dans un carter 6. Le perméat qui traverse la membrane se retrouve dans le carter et est envoyé dans le réservoir 7 de perméat. Le rétentat qui est retenu par la membrane s'appauvrit progressivement en les constituants du perméat (principalement le lactose et

les albumines) et est renvoyé dans le réservoir 1 d'où il peut être recyclé au module 4 autant de fois que nécessaire. Des manomètres 8 et 9 et un débitmètre 10 permettent de connaître les caractéristiques de l'écoulement du rétentat. On arrête l'opération lorsque le facteur de concentration intermédiaire désiré est atteint (typiquement 5 à 10).

A l'aide de l'installation de la figure 1, on a traité un lactosérum fourni par un fabricant de fromage dont les caractéristiques étaient approximativement les suivantes :

- azote total : 1,21 g/l
- azote soluble 1,18 g/l
- pH 7,5

Ce lactosérum contenait environ 7,5 g/l de protéines solubles dont :

- albumines : 6 g/l
- fractions immunoglobulines 0,8 g/l
- fraction lactoferrine +
lactoperoxydase 0,12 g/l

Dans un premier stade d'ultrafiltration, on a utilisé, comme membrane 5, une membrane poreuse minérale CARBOSEP, type M1 (seuil de coupure 60-80000 daltons) et on a poursuivi ce stade jusqu'à obtention d'un facteur de concentration de 5,56. Le débit du perméat était stable et se maintenait à 85 litres/heure/m² de surface de membrane.

Plus de 90% de la lactoferrine présente dans le lactosérum de départ se retrouvent dans le rétentat obtenu.

Dans une deuxième étape d'ultrafiltration, on a utilisé comme membrane 5, un faisceau de fines fibres poreuses parallèles AMICON, type HIP 100-20 (seuil de coupure de 50000) constituées d'un polymère cellulosique de structure anisotrope et on a traité le rétentat obtenu dans le premier stade jusqu'à obtention d'un facteur de concentration volumique de 22, soit un facteur de concentration global de $22 \times 5,56 = 121$. Les teneurs en lactoferrine et en protéines solubles du lactosérum de départ,

du rétentat intermédiaire et du rétentat final sont les suivantes :

	lactosérum initial	rétentat intermédiaire	rétentat final
5 Facteur de concentration	1	5,56	121
Lactoferrine*, g/l	0,11	0,56	7,5
10 Protéines solubles g/l	7,5	21,9	230

*Les teneurs en lactoferrine indiquées ont été déterminées par immuno-diffusion radiale. La précision estimée est de l'ordre de $\pm 15\%$. Les teneurs en protéines solubles ont été déduites du dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl.

Comme dans le premier stade, on a constaté une stabilité du débit du perméat à 85 l/h/m^2 . Il est à noter que les stades d'ultrafiltration sont effectués de préférence sur une plage de température de 30 à 50°C pour maintenir le liquide traité à une viscosité appropriée. Si désiré, un échangeur de chaleur peut être prévu avant l'entrée du module d'ultrafiltration pour maintenir la température à une valeur appropriée.

Sur la figure 2, on a représenté une installation de fractionnement chromatographique du rétentat final produit par l'ultrafiltration. Cette installation comprend un réservoir 11 du rétentat à traiter et un réservoir 12 d'éluant reliés à une vanne à trois voies 13. Une pompe péristaltique 14 permet d'alimenter à volonté une colonne chromatographique 15 en rétentat ou en éluant selon le réglage de la vanne 13. La colonne 15 est garnie d'un support ou gel chromatographique 16. A la sortie de la colonne 15, un détecteur optique 17 opérant à 280 nm permet de diriger sélectivement les fractions correspondant à chacun des pics séparés par chromatographie ainsi que le reste

d'éluant vers des cuves 22, 23, 24 et 25 respectivement. Le détecteur 17 est associé à un enregistreur 26. La colonne 15 avait un diamètre intérieur de 16 mm et était équipée de deux adaptateurs 27 permettant de régler la hauteur du support ou gel chromatographique. Cette hauteur a été réglée à 60 cm. La colonne était garnie d'un gel chromatographique SEPHADEX G 150 capable de séparer des molécules de masse molaire comprises entre 5000 et 300000 daltons. L'éluant utilisé est un tampon TRIS(tris-hydroxyméthyl/amino-méthane) 0,1 M, 1 M NaCl, pH 8 présentant une force ionique élevée limitant les agglomérations protéines-protéines. Le gel chromatographique était préalablement équilibré dans un tampon de force ionique élevé et de pH du même ordre que celui de l'éluant.

On a injecté dans la colonne un volume de rétentat à traiter correspondant à 10% du volume de la colonne, soit environ 12 ml. Le débit d'élution a été réglé, au cours de trois essais, à 30, 40 et 60 cm/heure (60, 80 et 120 ml d'éluant/heure) ce qui correspondait à un cycle total de 120, 90 et 60 mn, respectivement. Dans tous les cas, on a obtenu la séparation de trois fractions, à savoir une fraction albumines résiduelles, une fraction lactoferrine + lactoperoxydase et une fraction immunoglobulines.

La figure 3 représente un diagramme d'élution typique montrant la séparation des pics des diverses fractions.

REVENDICATIONS

1. Un procédé de séparation et de fractionnement des protéines de masse molaire élevée contenues dans un liquide chargé de ce type de protéines, qui comprend deux étapes :

a) une étape d'ultrafiltration visant à produire un rétentat enrichi en lesdites protéines et un perméat contenant le reste dudit liquide, et

b) une étape de fractionnement sélectif du rétentat obtenu en (a) sur un support chromatographique,

procédé caractérisé en ce que :

(i) l'ultrafiltration est effectuée avec une membrane poreuse ayant un seuil de coupure d'au moins 40000 daltons,

(ii) le liquide chargé de protéines à traiter par ultrafiltration présente un pH de 5 à 8,5 et une force ionique de 0,2 à 1 molaire, et

(iii) l'ultrafiltration (a) est poursuivie jusqu'à obtention d'un facteur de concentration d'au moins 40.

2. Un procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'ultrafiltration est poursuivie jusqu'à obtention d'un facteur de concentration d'au moins 100.

3. Un procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le liquide chargé de protéines a un pH de 7 à 8,5.

4. Un procédé selon la revendication 1, 2 ou 3, caractérisé en ce que le liquide chargé de protéines est du lactosérum.

5. Un procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le lactosérum est préalablement concentré.

6. Un procédé selon la revendication 4 ou 5, caractérisé en ce que le lactosérum est préalablement déca-séiné.

7. Un procédé selon la revendication 3, 4, 5 ou 6, caractérisé en ce que le lactosérum n'est pas déminéralisé.

8. Un procédé selon la revendication 1, 2 ou 3, caractérisé en ce que le liquide chargé de protéines est un lactosérum délipidé reconstitué par solubilisation,

à partir d'un lactosérum mis à l'état solide par des procédés classiques.

- 5 9. Un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'étape d'ultrafiltration est conduite en au moins deux stades.

FIG.:1

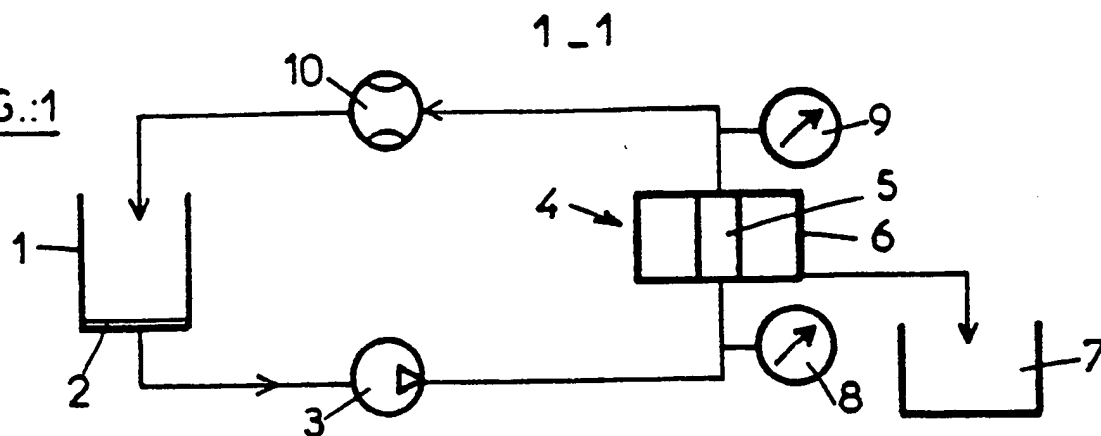
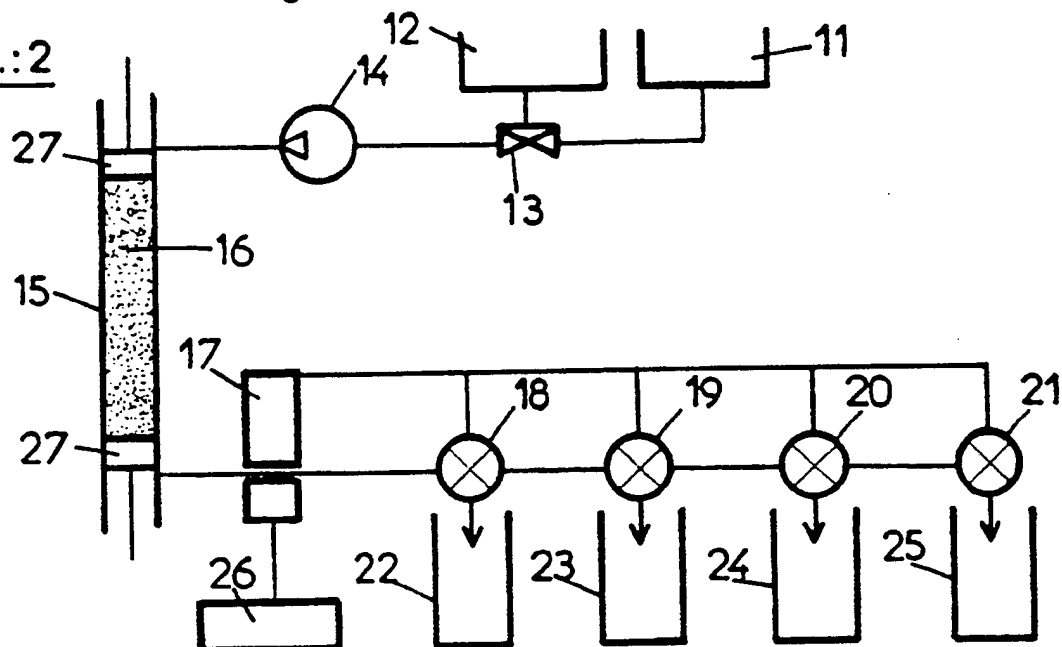
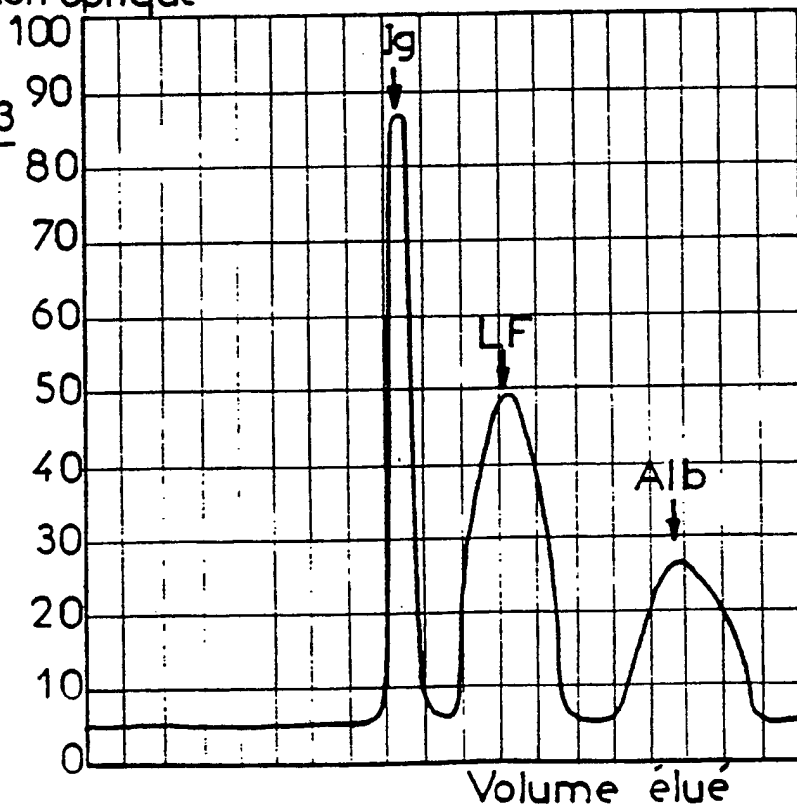


FIG.:2



Absorption optique

FIG.:3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 88/00192

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC <div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.2em;">Int. Cl.⁴ A 23 J 1/20</div>																							
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: right; font-size: 0.8em;">Minimum Documentation Searched ⁷</div> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 25%; border: none; vertical-align: top;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> Classification System </div> </td> <td style="width: 75%; border: none; vertical-align: top;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> Classification Symbols </div> </td> </tr> <tr> <td style="border: none; vertical-align: top;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> Int. Cl.⁴ </div> </td> <td style="border: none; vertical-align: top;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> A 23 J </div> </td> </tr> </table> <div style="text-align: center; font-size: 0.8em; margin-top: 5px;"> Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸ </div>			<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> Classification System </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> Classification Symbols </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> Int. Cl.⁴ </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> A 23 J </div>																	
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> Classification System </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> Classification Symbols </div>																						
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> Int. Cl.⁴ </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> A 23 J </div>																						
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%; font-size: 0.8em;">Category ¹⁰</th> <th style="width: 60%; font-size: 0.8em;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 30%; font-size: 0.8em;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">X</td> <td style="vertical-align: top;">FR, A, 2605322 (APPLICATIONS TECHNIQUES NOUVELLES) 22 April 1988, see claims 1-9; page 6</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1, 4, 9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">Y</td> <td style="vertical-align: top;">--</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">3, 5-8</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">A</td> <td style="vertical-align: top;">--</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">2</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">Y</td> <td style="vertical-align: top;">FR, A, 2204948 (FORBMOST-McKESSON INC.) 24 May 1974, see claims 1, 6, 8-10; example 1</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">5-8</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">Y</td> <td style="vertical-align: top;">FR, A, 2452881 (FROMAGERIES BEL) 31 October 1980, see claims 1, 2, 8-11; example 1; page 4, lines 6-9</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">3</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center; padding-top: 10px;">-----</td> </tr> </tbody> </table>			Category ¹⁰	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	X	FR, A, 2605322 (APPLICATIONS TECHNIQUES NOUVELLES) 22 April 1988, see claims 1-9; page 6	1, 4, 9	Y	--	3, 5-8	A	--	2	Y	FR, A, 2204948 (FORBMOST-McKESSON INC.) 24 May 1974, see claims 1, 6, 8-10; example 1	5-8	Y	FR, A, 2452881 (FROMAGERIES BEL) 31 October 1980, see claims 1, 2, 8-11; example 1; page 4, lines 6-9	3	-----		
Category ¹⁰	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³																					
X	FR, A, 2605322 (APPLICATIONS TECHNIQUES NOUVELLES) 22 April 1988, see claims 1-9; page 6	1, 4, 9																					
Y	--	3, 5-8																					
A	--	2																					
Y	FR, A, 2204948 (FORBMOST-McKESSON INC.) 24 May 1974, see claims 1, 6, 8-10; example 1	5-8																					
Y	FR, A, 2452881 (FROMAGERIES BEL) 31 October 1980, see claims 1, 2, 8-11; example 1; page 4, lines 6-9	3																					

<div style="font-size: 0.8em;"> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div> </div>																							
IV. CERTIFICATION <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center; font-family: monospace;">24 November 1988 (24.11.88)</div> </div> </td> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center; font-family: monospace;">13 December 1988 (13.12.88)</div> </div> </td> </tr> <tr> <td style="border: none; vertical-align: top;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> International Searching Authority <div style="text-align: center; font-family: monospace;">European Patent Office</div> </div> </td> <td style="border: none; vertical-align: top;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> Signature of Authorized Officer </div> </td> </tr> </table>			<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center; font-family: monospace;">24 November 1988 (24.11.88)</div> </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center; font-family: monospace;">13 December 1988 (13.12.88)</div> </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> International Searching Authority <div style="text-align: center; font-family: monospace;">European Patent Office</div> </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> Signature of Authorized Officer </div>																	
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center; font-family: monospace;">24 November 1988 (24.11.88)</div> </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center; font-family: monospace;">13 December 1988 (13.12.88)</div> </div>																						
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> International Searching Authority <div style="text-align: center; font-family: monospace;">European Patent Office</div> </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> Signature of Authorized Officer </div>																						

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 8800192
SA 22025

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 02/12/88
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A- 2605322	22-04-88		
FR-A- 2204948	24-05-74	NL-A- 7314953	03-05-74
		DE-A, C 2354195	22-05-74
		BE-A- 806796	30-04-74
		US-A- 3876805	08-04-75
		AU-A- 6210773	01-05-75
		GB-A- 1455142	10-11-76
		GB-A- 1455143	10-11-76
		CA-A- 1007511	29-03-77
		JP-A- 49100252	21-09-74
FR-A- 2452881	31-10-80	FR-A, B 2486363	15-01-82

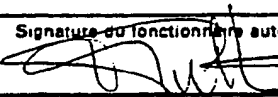
EPO FORM P0479

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 88/00192

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB ⁴ : A 23 J 1/20		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁴	A 23 J	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie [*]	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
X	FR, A, 2605322 (APPLICATIONS TECHNIQUES NOUVELLES) 22 avril 1988, voir revendications 1-9; page 6	1, 4, 9
Y		3, 5-8
A		2
Y	FR, A, 2204948 (FORBMOST-McKESSON INC.) 24 mai 1974, voir revendications 1, 6, 8-10; exemple 1	5-8
Y	FR, A, 2452881 (FROMAGERIES BEL) 31 octobre 1980, voir revendications 1, 2, 8-11; exemple 1; page 4, lignes 6-9	3

<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>[*] Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
24 novembre 1988	13 DEC 1988	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	 P.C.G. VAN DER PUTTEN	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 8800192
SA 22025

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche international visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 02/12/88
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A- 2605322	22-04-88	Aucun	
FR-A- 2204948	24-05-74	NL-A- 7314953	03-05-74
		DE-A, C 2354195	22-05-74
		BE-A- 806796	30-04-74
		US-A- 3876805	08-04-75
		AU-A- 6210773	01-05-75
		GB-A- 1455142	10-11-76
		GB-A- 1455143	10-11-76
		CA-A- 1007511	29-03-77
		JP-A- 49100252	21-09-74
FR-A- 2452881	31-10-80	FR-A, B 2486363	15-01-82

EPO FORM 10072

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)